



AUSLEGESCHRIFT 1117134

V 18750 IV b/12q

ANMELDETAG: 4. JUNI 1960

BEKANNTMACHUNG

DER ANMELDUNG

UND AUSGABE DER

AUSLEGESCHRIFT: 16. NOVEMBER 1961

1

Als Hilfsmittel für die Synthese von Peptiden ist eine große Anzahl von Gruppen vorgeschlagen worden, welche die endständige Aminogruppe schützen und zum Schluß der Synthese wieder leicht entfernt werden können. Von diesen wird der Carbobenzoxyst am häufigsten angewendet. Alle praktisch angewandten Schutzgruppen besitzen die Eigenschaft, daß sie sich nur auf hydrolytischem oder reduktivem Wege abtrennen lassen.

In der Formylgruppe wurde nun ein Rest gefunden, der ebenfalls die Wirkung einer Schutzgruppe für terminale Aminogruppen besitzt, sich aber nach vollzogener Peptidbildung auf oxydativem Wege abspalten läßt. Als besonders geeignet zur Abtrennung dieser Gruppe aus synthetischen Formyl-Peptiden erwiesen sich wäßrige Wasserstoffperoxydlösungen mäßiger Konzentration.

Es ist bereits bekannt, Peptidsynthesen unter Verwendung der N-Formyl-Schutzgruppe durchzuführen, wobei dann aber die Formylgruppe mittels alkoholischer Salzsäure abgespalten wurde; hierbei wurden indessen schlechte Ausbeuten erhalten (Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, 13 [1956], S. 460).

Es ist ferner versucht worden, als oxydativ mittels Wasserstoffperoxyd entfernbare Schutzgruppe den Rest der Brenztraubensäure zu verwenden, jedoch mit geringem Erfolg (Angew. Chemie, 69 [1957], S. 363, linke Spalte, Abs. 2).

Die erfindungsgemäße Verwendung der Formylgruppe bringt mehrere methodische Vorteile. Die Einführung der Formylgruppe in die Ausgangsaminosäure gelingt bequem und in guter Ausbeute mittels konzentrierter Ameisensäure und Essigsäureanhydrid, also leicht zugänglichen und billigen Reagenzien. Aus der so gewonnenen Formylaminosäure wird nach bekannten Methoden ein Formyl-Peptid synthetisiert und von diesem die Formylgruppe dann oxydativ wieder abgetrennt. Diese oxydative Abtrennung weist gegenüber den sonst üblichem hydrolytischen oder reduktiven Verfahren zur Entfernung der Schutzgruppe verschiedene Vorzüge auf: Die Abtrennung kann in kurzer Zeit ohne besondere Vorkehrungen mit einem jederzeit greifbaren Reagenz, z. B. Wasserstoffperoxyd, durchgeführt werden, wobei ein Überschuß dieses Oxydationsmittels auf Grund seiner Flüchtigkeit nicht stört. Die Oxydationsbedingungen lassen sich in weiten Grenzen variieren, und die Oxydation kann, was wegen der Unlöslichkeit höherer Peptide in organischen Lösungsmitteln von Wichtigkeit ist, in wäßriger Lösung vorgenommen, also auch empfindlichen Peptiden angepaßt werden. Außerdem werden

Verfahren zur Herstellung von Peptiden
unter Verwendung einer oxydativ
entfernbarer Schutzgruppe

Anmelder:

VEB Berlin-Chemie,
Berlin-Adlershof, Glienicker Weg 181

Dr. Günter Losse und Werner Zönnchen,
Halle/Saale,
sind als Erfinder genannt worden

2

die nach diesem Verfahren gewonnenen freien Peptide
in guter Ausbeute und sehr rein erhalten.

Beispiele

1. DL-Alanyl-alanin

a) Formyl-DL-alanin

17,8 g DL-Alanin wurden in 336 ml 100%iger Ameisensäure gelöst und unter Rühren bei Zimmertemperatur tropfenweise 112 ml Essigsäureanhydrid eingetragen. Nach 1stündiger Reaktionsdauer wurde die Lösung im Vakuum bis zur Trockne eingedampft. Die erhaltene Kristallmasse wurde aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute: 77%; Schmp.: 149°C.

b) Formyl-DL-alanyl-alanin-äthylester

3,51 g Formyl-DL-alanin wurden in 200 ml Dioxan unter Erwärmen in Lösung gebracht. Zu der erkalteten Lösung wurden 3,51 g DL-Alaninäthylester in 20 ml Methylenchlorid sowie 6,5 g N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimid in 20 ml Methylenchlorid unter Rühren bei Raumtemperatur gegeben. Die Lösung wurde 2 Stunden gerührt und über Nacht stehengelassen. Nach Absaugen des ausgeschiedenen Harnstoffes wurde das Lösungsmittel im Vakuum bei 35°C vollständig entfernt, der Rückstand in 150 ml Methylenchlorid aufgenommen und mit 25 ml 5%iger Salzsäure sowie 25 ml 5%iger Natriumbicarbonatlösung und Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Methylenchlorid im Vakuum entfernt und aus dem Rückstand der Formyl-Peptidester mit heißem Wasser herausgelöst. Die wäßrige Lösung wurde dann im Vakuum bis zur

109 739/404

Kristallabscheidung konzentriert. Ausbeute: 60%; Schmp.: 95 bis 97°C aus Essigester—Petroläther.

c) Formyl-DL-alanyl-alanin

2 g Formyl-DL-alanyl-alaninester wurden in 20 ml Dioxan gelöst und dann 40 ml 0,320 n-Barytlauge zugegeben. Nach 1stündiger Verseifungsdauer wurde mit der äquivalenten Menge 1 n-Schwefelsäure neutralisiert, der Bariumsulfatniederschlag in der Wärme abfiltriert und das Filtrat im Vakuum bis zur beginnenden Kristallabscheidung eingeeengt, dann über Nacht stehengelassen und nach der Abtrennung der Kristallmasse die Mutterlauge nochmals eingeeengt. Ausbeute: 89%; Schmp.: 161 bis 163°C aus Essigester.

d) Entfernung der Formylgruppe

2,7 g Formyl-DL-alanyl-alanin wurden mit 16,5 ml 15%igem Wasserstoffperoxyd 2 Stunden bei 60°C auf dem Wasserbad erwärmt. Anschließend wurde die Lösung mit Salzsäure auf pH 2 bis 3 gebracht und durch Extraktion mit Essigester im Kutscher-Steudel-Apparat von Resten des Formyl-Peptids befreit. Nach Eindampfen der wäßrigen Lösung und Trocknen des Rückstandes über P_2O_5 : DL-Alanyl-alanin · HCl. Ausbeute: 90%; Schmp.: 98 bis 102°C.

2. L-Valyl-glycin

a) Formyl-L-valin

20 g L-Valin wurden in 341 ml Ameisensäure gelöst und unter Rühren bei Eiskühlung 119,6 ml Acetanhydrid zugegeben. Nach 2stündiger Reaktionsdauer wurden 110 ml Wasser hinzugefügt und die Lösung im Vakuum eingedampft. Es wurden 22,5 g Formyl-L-valin gewonnen. Ausbeute: 83%; Schmp.: 152 bis 153°C aus Essigester; $[\alpha]_D^{25}$: +17,0°.

b) Formyl-L-valyl-glycin-äthylester

Die Darstellung des Formyl-Peptidesters erfolgte nach J. C. Sheehan und Mitarbeiter, J. Amer. chem. Soc., 80, 1154 [1958]. Ausbeute: 82%; Schmp.: 154°C aus Essigester; $[\alpha]_D^{25}$: -50,8°.

c) Formyl-L-valyl-glycin

4,2 g Formyl-L-valyl-glycinester wurden in 40 ml Äthanol gelöst und mit 55 ml 0,467 n-Barytlauge versetzt. Die Verseifungsdauer betrug 1 Stunde. Nach der darauffolgenden Neutralisation mit 22,2 ml 1 n-Schwefelsäure wurde der Niederschlag abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingeeengt. Ausbeute: 81%; Schmp.: 219 bis 221°C aus Wasser; $[\alpha]_D^{25}$: -48,8°.

d) Entfernung der Schutzgruppe

1 g Formyl-Peptid wurde mit 8 g 15%igem Wasserstoffperoxyd 2 Stunden bei 60°C umgesetzt. Die

weitere Aufarbeitung erfolgte wie bei Beispiel 1, d). Ausbeute: 70%; Hydrochlorid Schmp.: 144 bis 147°C; $[\alpha]_D^{25}$: +42,8°.

3. Glycyl-L-valin

a) Formyl-glycin

15 g Glycin (0,2 Mol) wurden in 336 ml Ameisensäure gelöst und 112 ml Acetanhydrid tropfenweise unter Rühren zugeführt. Die Temperatur stieg bis auf 45°C an. Nach Konzentrierung der Lösung im Vakuum wurde das Formyl-glycin aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute: 85%; Schmp.: 149 bis 151°C.

b) Formyl-glycyl-L-valinäthylester

3,09 g Formyl-glycin (0,03 Mol) wurden in einem Gemisch von 150 ml aus gleichen Anteilen Dioxan und Methylenchlorid gelöst. Dazu wurden 4,35 g (0,03 Mol) L-Valinester in 15 ml Methylenchlorid und die äquimolekulare Menge N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimid hinzugefügt. Die weitere Verarbeitung erfolgte entsprechend Beispiel 1, b). Ausbeute: 86%; $[\alpha]_D^{25}$: -14,3°.

c) Formyl-glycyl-L-valin

6 g des öligen Formyl-glycyl-L-valinäthylesters wurden in 40 ml Äthanol gelöst und zur Verseifung 85 ml 0,375 n-Barytlauge hinzugefügt. Die Verseifungsdauer betrug 1 Stunde. Nach Abfiltrieren des Bariumsulfatniederschlags in der Wärme wurde das Filtrat im Vakuum auf dem Wasserbad bei 35°C eingeeengt. Ausbeute: 86%; Schmp.: 244 bis 247°C aus Alkohol—Essigester; $[\alpha]_D^{25}$: +12,9°.

d) Entfernung der Schutzgruppe

Das Dipeptid wurde nach der Oxydation mit 6 Äquivalenten 15%igem Wasserstoffperoxyd unter den üblichen Bedingungen als Hydrochlorid isoliert. Ausbeute: 70%; $[\alpha]_D^{25}$: -6,2°.

PATENTANSPRUCH:

Verfahren zur Herstellung von Peptiden unter Verwendung einer oxydativ entfernbaren Schutzgruppe, dadurch gekennzeichnet, daß man als N-terminale Schutzgruppe die Formylgruppe in an sich bekannter Weise einführt und nach in an sich bekannter Weise erfolgter Bildung des Peptids die Formylgruppe oxydativ, vorzugsweise mittels wäßriger Wasserstoffperoxydlösung, wieder entfernt.

In Betracht gezogene Druckschriften:
Fortschritte d. Chemie organ. Naturstoffe, 13 (1956), S. 460;
Angew. Chemie, 69 (1957), S. 363.